

Яковлев Алексей Валерьевич

РОЛЬ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ
В РЕАЛИЗАЦИИ ЭФФЕКТОВ ОКСИДА АЗОТА (II) НА
СЕКРЕЦИЮ МЕДИАТОРА И ИОННЫЕ ТОКИ
ДВИГАТЕЛЬНОГО НЕРВНОГО ОКОНЧАНИЯ

03.00.13 - физиология

03.00.02 - биофизика

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

КАЗАНЬ - 2004

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных Казанского государственного университета и на кафедре нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета.

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Зефилов Андрей Львович
кандидат биологических наук, доцент Ситдикова Гузель Фаритовна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Гайнутдинов Халил Латыпович
доктор физико-математических наук, доцент Котов Николай Викторович

Ведущая организация - Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

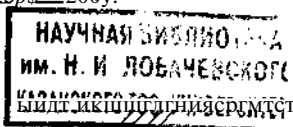
Защита состоится 7 СУ И Р Я 200 г. в 1 часов на заседании диссертационного совета Д 212.078.02 по присуждению ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.00.13 - физиология и 03.00.02 - биофизика при Казанском государственном педагогическом университете

(420021, г.Казань, ул. Межлаука, д. 1).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Казанского государственного педагогического университета по адресу: Казань, ул. Межлаука, д. 1.

Автореферат разослан 7 СУ И Р Я 200 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



НАУЧНАЯ БИБЛ!



000001

Зефилов Т.Л.

Актуальность исследования. Оксид азота (II) (NO) обладает широким спектром биологического действия. Впервые NO стал рассматриваться в качестве регулятора физиологических процессов после исследований природы релаксирующего фактора, синтезируемого эндотелиоцитами сосудов [Ignarro, 1987. Furchott, 1989, Moncada, 1992]. Впоследствии было показано, что NO является нейротрансмиттером и нейромодулятором во многих периферических и центральных синапсах, оказывая как ингибирующее, так и активирующее влияние на синаптическую передачу [Bredt, Snyder, 1992; Зефилов, Уразаев, 1999; Меньшиков и др., 2000]. NO усиливает посттетаническую потенциацию в нейронах гиппокампа и мозжечка, освобождение медиатора из нейронов переднего мозга и стриатума [Shuman, Madison, 1994], уменьшает секрецию медиатора из синапсом кортикальных нейронов [Lonart et al., 1992; Pan et al., 1996] амплитуду сокращения диафрагмальной мышцы крысы, действуя на пресинаптическом уровне [Stamler, Meissner, 2001], усиливает некантовое высвобождение медиатора из двигательных нервных окончаний теплокровных [Mukhtarov et al., 1999]. Основным «рецептором» для NO в различных тканях является растворимая гуанилатциклаза [Arnold, et al, 1977], активация которой приводит к повышению внутриклеточной концентрации цГМФ и соответствующих протеинкиназ [Schmidt, Lohmann, 1993; Chao et al., 1997; Andreopoulos, Papapetropoulos, 2000; Hofmann et al., 2000; Schwede et al., 2000; Крутецкая и др., 2003]. Значительная неоднородность эффектов NO, их видо- и тканеспецифичность предполагает наличие цГМФ-независимых механизмов реализации функций NO.

В нервно-мышечном соединении холоднокровных обнаружена тоническая регуляция освобождения медиатора с помощью NO. Показано, что NO угнетает вызванную секрецию медиатора и модифицирует калиевые каналы нервного окончания [Lindgren, Laird, 1994, Зефилов и др., 1999а,б, Thomas, Robitaille, 2001]. Внутриклеточные механизмы действия NO в нервно-мышечном синапсе остаются неизвестными. Предполагается, что в эффектах NO участвуют не одна, а несколько внутриклеточных сигнальных систем [Thomas, Robitaille, 2001 Яковлев и др., 2002]. Учитывая значительную роль аденилатциклазной системы в регуляции освобождения медиатора, актуальным является изучение роли как цГМФ-, так и цАМФ-опосредованных систем передачи сигналов в эффектах NO на нервно-мышечный синапс. Исследование внутриклеточных механизмов влияния экзогенного и эндогенного NO на функцию нервно-мышечного синапса позволит выявить основные мишени его действия при модуляции синаптических функций.

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования - выяснение внутриклеточных механизмов действия NO на функционирование нервно-мышечного синапса лягушки.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучить эффекты ряда экзогенных и эндогенных доноров N0 на вызванную секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания.
2. Исследовать роль системы гуанилатциклазы/цГМФ в регуляции ионных токов и секреции медиатора, осуществляемой N0 в нервно-мышечном соединении.
3. Выяснить участие метаболического каскада аденилатциклазы/цАМФ/протеинкиназы А в реализации эффектов N0 на секрецию медиатора и ионные токи нервного окончания.
4. Установить роль цГМФ-зависимых цАМФ-специфичных фосфодиэстераз в механизме модуляторного действия N0 на секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания лягушки.

Положения, выносимые на защиту

1. Гуанилатциклазная и аденилатциклазная внутриклеточные сигнальные системы реализуют эффекты N0 в нервно-мышечном соединении лягушки через изменение активности цГМФ-зависимых фосфодиэстераз.
2. Мишенью N0 в двигательном нервно-мышечном соединении, опосредующей его эффекты на ионные токи и вызванную секрецию медиатора, является цАМФ-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа А).

Научная новизна. Проведено исследование внутриклеточных механизмов влияния N0 на ионные токи двигательного нервного окончания и секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки. Впервые установлены внутриклеточные механизмы, опосредующие эффекты N0 на потенциалзависимый калиевый ток и вызванную секрецию медиатора у холоднокровных. Показано, что повышение внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов (цГМФ и цАМФ) снимает ингибиторное действие N0 на секрецию ацетилхолина и позитивное влияние на потенциалзависимый K^{*} -ток. В результате проведенных исследований впервые выявлено участие двух метаболически связанных сигнальных каскадов в эффектах N0: аденилатциклазного и гуанилатциклазного. Предполагается, что изменение концентрации цАМФ и протеинкиназы А под действием N0 опосредуется через активацию цГМФ-стимулируемой цАМФ-специфичной фосфодиэстеразы. Впервые показано, что N0 ингибирует кальциевый ток двигательного нервного окончания лягушки

Научно-практическая ценность. Теоретическое значение исследования заключается в расширении представлений о механизмах регуляции работы нервно-мышечного синапса. Полученные экспериментальные данные могут служить основой для понимания возможных взаимодействий N0 с другими медиаторными и гормональными системами и для изучения патогенеза и механизмов заболеваний, сопровождающихся нарушением синаптической функции, а также для целенаправленного синтеза новых фармакологических агентов, модулирующих работу ионных каналов нервного окончания и

синаптическую передачу. Результаты исследования представляют практическую ценность для физиологов, биофизиков, биохимиков, фармакологов и нейрхимиков при изучении влияния нейромодуляторов, систем вторичных и газообразных посредников на синаптическую передачу и двигательный аппарат. Полученные данные используются при чтении лекций на кафедрах физиологии человека и животных Казанского государственного университета и нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены на научной конференции и школе-семинаре молодых учёных и учителей (Казань, 1999, 2001), Всероссийской научно-практической конференции "Актуальные проблемы валеологии и синаптологии" (Набережные Челны, 1999), V Международном конгрессе нейробиологии (Иерусалим, 1999), Всероссийской школе молодых ученых "Актуальные проблемы нейробиологии" (Казань, 1999, 2000), XVIII Съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Казань, 2001), Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс», (Новосибирск, 2000, 2001), Международной конференции «Функциональная роль монооксида азота и пуринов» (Минск, 2001), Всероссийском научном симпозиуме «Растущий организм: адаптация к физической и умственной нагрузке» (Казань, 2000, 2001), Конференции молодых ученых "Биология - наука 21-го века" (Пушино, 2001, 2002), IV Съезде физиологов Сибири (Новосибирск, 2002), Школе-семинаре «Фармакология синаптической передачи в нервной системе» (Киев, 2002), Международной конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности (Москва, 2003), Международном Симпозиуме «Внутриклеточная регуляция дифференциации и пластичности нейрона» (Москва, 2003), Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2003), Международной конференции «Медиаторы в формировании нейрональных сетей» (Ля Сиота, Франция, 2003).

По теме диссертации опубликовано 23 работы.

Структура и объем диссертации. Диссертация объемом 130 страниц состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы и сокращений. Список цитируемой литературы включает 251 название, из них 29 отечественных и 221 иностранных авторов. Диссертация содержит 18 рисунков и 2 таблицы.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах кожно-грудинной и портняжной мышц лягушек *Rana ridibunda* и *Rana temporaria* в осенне-зимний период. Под эфирным наркозом лягушек декапитировали и производили препаровку. Все эксперименты выполнены в

условиях постоянной наружной перфузии препарата со скоростью 5 мл/мин раствором Рингера для холоднокровных животных (в мМ): NaCl - 118.0; KCl - 2.5; CaCl - 0.3-0.4; Mg^{2+} - 2.0; $NaHCO_3$ - 2.4 (t $20 \pm 0.5^\circ C$, pH 7.2-7.4). Для регистрации Ca^{2+} -токов использовали модифицированный раствор Рингера, содержащий (в мМ): CaCl₂ - 0.9; MgCl₂ - 10; 4-аминопиридин - 0.1; тетраэтиламмоний - 0.25. В экспериментах использовались следующие фармакологические препараты фирмы Sigma: доноры NO - нитропруссид натрия (SNP), S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) и гидроксилламин солянокислый; субстрат для NO-синтазы - L-аргинин; хелатор NO - гемоглобин; мембранопроницаемые, негидролизуемые аналоги цГМФ и цАМФ (8Br-цГМФ, dB-цГМФ, 8Br-цАМФ); блокатор фосфодиэстеразы V (запринаст); блокаторы аденилатциклазы и гуанилатциклазы - cis-N-(2-phenylcyclopentyl) azacyclotridec-1-en-amine hydrochloride (PCA) и 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one - (ODQ), соответственно; блокаторы фосфодиэстераз II и III - erythro-9-(2-hydroxy-3nonyl)-adenine) hydrochloride (EHNA) и милринон, соответственно; ингибитор протеинкиназы A - N-2-(p-bromocinnamyl-amino)-ethyl-5-isoquino-lihe sulfonamide dihydrochloride (H-89). Водонерастворимые вещества перед началом эксперимента растворяли в 0.1% растворе диметилсульфоксида (Sigma, США).

Регистрацию биопотенциалов производили с помощью микроэлектродов с диаметром кончика 2-3 мкм, заполненных раствором NaCl (2 М) или раствором Рингера (для перинеурального отведения) и имеющих сопротивление 2-5 Мом. Использовали следующие методы регистрации синаптических сигналов: внеклеточный и перинеуральный. В различных участках нервной терминали форма внеклеточно регистрируемых ответов нервного окончания (НО) неодинакова. В экспериментах исследовали трехфазные ответы НО, регистрируемые в проксимальной части терминали - 5-30 мкм от последнего миелинизированного сегмента нервного волокна. Известно, что положительные фазы ответа отражают выходящие токи, а отрицательные - входящие токи через мембрану НО под электродом. С использованием специфических блокаторов ионных каналов было установлено, что 1-ая положительная фаза представляет собой пассивный ток, генерируемый распространяющимся потенциалом действия (ПД). 2-ая отрицательная фаза отражает Na^+ -ТОК в месте отведения. Оба этих тока - деполяризующие. 3-ья положительная фаза отражает K^+ -токи НО через потенциалзависимые и кальцийактивируемые K^+ -каналы [Mallart, 1985; Зефилов, Халилов, 1985]. Входящий Ca^{2+} -ток НО, имеет небольшую амплитуду, и при внеклеточном отведении маскируется выходящими K^+ -токами, поэтому для выявления Ca^{2+} -тока НО использовали метод перинеурального отведения. Микроэлектрод подводили к аксону в области последних миелиновых сегментов, затем прокалывали периневрй. В результате регистрировали трехфазные перинеуральные токи, отражающие активность дистально расположенных нервных терминалей. Известно, что 1-ая положительная фаза отражает пассивную деполяризацию мембраны при распространении ПД. Отрицательная фаза состоит из двух пиков: первый представляет собой входящий Na^+ -ток через Na^+ каналы перехватов Ранвье, второй пик отражает K^+ -

токи NO. Появление второго пика вызвано тем, что выходящий K^+ -ток в начальной части NO, имеющий большую величину, чем в перехвате Ранвье, приводит к появлению входящих локальных токов в месте отведения. Добавление в раствор 4-аминопиридина и тетраэтиламмония приводит к угнетению потенциалзависимых и кальцийактивируемых K^+ -каналов (исчезновению 2-го пика) и появлению 3-ей (положительной) фазы, отражающей суммарный Ca^{2+} -ток дистально расположенных нервных терминалей. Ca^{2+} -каналы имеют высокую плотность в NO, поэтому входящий Ca^{2+} -ток в NO вызывает локальные токи, которые регистрируются периневральным микроэлектродом как выходящие [Mallart, 1985; Mallart, 1989; Redman, Silinsky, 1995].

Определяли следующие параметры периневрального ответа и ответа NO: 1) длительность второй и третьей фазы; 2) амплитуду второй и третьей фазы; 3) амплитуду токов концевой пластинки (ТКП). Квантовый состав ТКП (m) определяли по формуле: $m = \ln N/N_0$; где N - количество раздражений, N_0 - количество раздражений, не вызвавших ТКП [Каменская, 1972]. Для анализа и последующей обработки параметров сигналов использовали автоматизированную систему, созданную на базе АЦП L-CARD-1250 и Pentium-III с использованием оригинальной программы «Ritm» (автор программы - Т.В. Лайков). Среднее значение в серии получали по результатам экспериментов на 5-12 животных. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента в программе Microcal Origin 6.1 (Microcal Software, Inc. 1991-2000).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эффекты экзогенных и эндогенных доноров NO на вызванную секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания лягушки. Известно, что NO и его доноры при низких внеклеточных концентрациях ионов Ca^{2+} оказывают угнетающее действие на вызванную и спонтанную секрецию медиатора, активирующее действие на потенциалзависимый и ингибирующее - на кальцийактивируемый калиевые токи [Lindgren, Laird, 1994; Зефиоров и др., 1999a,б; Thomas, Robitaille, 2001]. В качестве доноров экзогенного NO использовали SNP (100 мкМ) и SNAP (250 мкМ), которые в водных растворах распадаются с образованием NO. В растворе Рингера с низкой концентрацией ионов Ca^{2+} (0.3-0.4 мМ) SNP или SNAP через 40 мин действия снижали среднюю амплитуду ТКП до $17.3 \pm 3.2\%$ ($n=12$; $p<0.05$) и 21.5 ± 6.8 ($n=6$; $p<0.05$), соответственно, от исходной величины. Снижение амплитуды ТКП сопровождалось уменьшением квантового состава ТКП, который к 40 мин снижался до $11.26 \pm 1.1\%$ ($n=12$; $p<0.05$) и $10.6 \pm 6.6\%$ ($n=6$; $p<0.05$), соответственно, от исходной величины (рис. 1). На фоне действия экзогенных доноров NO происходило постепенное увеличение амплитуды третьей положительной фазы ответа, отражающей выходящие калиевые токи, которая возрастала до $275.0 \pm 13.8\%$ ($n=12$; $p<0.05$) и $196.2 \pm 10.3\%$ ($n=6$; $p<0.05$),

соответственно, исходной величины (рис. 1). Полученные эффекты SNP и SNAP отмывались очень медленно.

Эндогенный донор NO - гидроксилламин в концентрации 1 мМ также снижал среднюю амплитуду и квантовый состав ТКП до $57.8 \pm 5.4\%$ и $66.8 \pm 12.0\%$ ($n=5$; $p<0.05$), соответственно, относительно исходной величины. При этом амплитуда 3-ей фазы ответа НО увеличивалась до $146.4 \pm 2.4\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля.

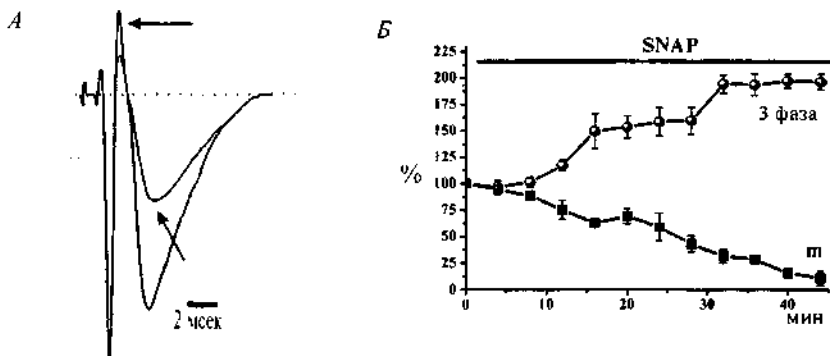


Рис. 1. Влияние донора NO - SNAP на ионные токи нервного окончания и секрецию медиатора. А. - Усредненные ответы (30 реализаций) в норме и при действии SNAP (250 мкМ). Эффекты SNAP показаны стрелками. Б. - Изменение 3 фазы ответа нервного окончания (НО) и квантового состава токов концевой пластинки (ТКП) (m). По оси абсцисс - время в мин от начала эксперимента, по оси ординат - изменение квантового состава ТКП (•) и третьей фазы ответа НО (•) в % относительно исходных значений.

Влияние субстрата для NO-синтазы - L-аргинина на нервно-мышечную передачу. L-аргинин в концентрации 100 мкМ через 40 мин действия снижал среднюю амплитуду ТКП до $53.2 \pm 4.5\%$ и квантовый состав ТКП - до $80.1 \pm 5.8\%$ ($n=12$; $p<0.05$) относительно контроля. Амплитуда 3-ей фазы ответа НО возросла до $112.7 \pm 3.5\%$ ($n=12$; $p<0.05$) относительно исходной величины. Таким образом, добавляя субстрат для синтеза NO - L-аргинин, мы усиливали процесс образования эндогенного NO, что приводило к появлению эффектов, сходных с теми, которые были получены в результате воздействия экзогенного NO. L-аргинин и гидроксилламин по сравнению SNP и SNAP оказывали менее выраженное воздействие на вызванную секрецию медиатора и потенциалзависимый K^+ -ток, что свидетельствует о том, что в норме для модуляции синаптической передачи NO-синтаза образует меньшую концентрацию NO, чем мы получаем при использовании экзогенных доноров NO.

Для выяснения места синтеза NO в нервно-мышечном синапсе использовали гемоглобин (15 мкМ), который способен связывать NO, находящийся в синаптической щели, предотвращая тем самым его межклеточную диффузию

[Martin et al., 1985]. Добавление гемоглобина в перфузируемый раствор вызывало увеличение средней амплитуды и квантового состава ТКП до $175.6 \pm 10.1\%$ и $281.4 \pm 11.4\%$ ($n=3$; $p<0.05$), соответственно, и постепенное снижение амплитуды 3-ей фазы ответа NO до $73.1 \pm 2.4\%$ ($n=3$; $p<0.05$) относительно контроля. Известно, что NO может тонически вырабатываться мышечной клеткой и действовать на нервное окончание как ретроградный мессенджер [Chao et al., 1997; Descarries et al., 1998; Ribera et al., 1998], поэтому связывание NO гемоглобином приводит к эффектам противоположным действию NO. На фоне действия гемоглобина L-аргинин угнетал вызванную секрецию медиатора и увеличивал амплитуду потенциалзависимого K^+ -тока NO в меньшей степени по сравнению с контрольными экспериментами. Квантовый состав ТКП снижался до $78.1 \pm 3.7\%$ ($n=3$; $p<0.05$) относительно контроля, а амплитуда 3 фазы ответа NO увеличивалась до $106.2 \pm 2.9\%$ ($n=3$; $p>0.05$) относительно контроля, что свидетельствует о наличии дополнительных источников NO в области синапса. Можно предположить, что, кроме мышечных волокон, NO-синтазы имеются в шванновской клетке, а также возможно наличие собственной NO-синтазы в двигательном NO.

В следующих сериях экспериментов мы использовали SNP (100 мкМ) и SNAP (250 мкМ) в качестве доноров NO, так как они проявляли максимальные эффекты на секрецию медиатора и ионные токи NO.

Эффекты NO на кальцевый ток двигательного NO¹. В наших исследованиях с использованием ряда экзогенных и эндогенных доноров NO, а также в предыдущих работах нашей лаборатории [Зефилов и др., 1999] было показано, что при действии NO происходит увеличение потенциалзависимого и уменьшение кальцийактивируемого K^+ -токов NO. Рост потенциалзависимого K^+ -тока укорачивает длительность ПД, уменьшает приток ионов Ca^{2+} в нервную терминаль и снижает секрецию медиатора [Van der Kloot, Molgo, 1994; Redman, Silinsky, 1995]. Однако, эффекты NO могут быть связаны с непосредственным угнетающим влиянием на Ca^{2+} -ток через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы N-типа. Для регистрации Ca^{2+} -тока использовали отведение электрических сигналов от периневральной области двигательного нерва в условиях ингибирования всех K^+ -каналов [Mallart, 1989; Redman, Silinsky 1995]. Аппликация в перфузируемый раствор SNAP вызывала быстрое и достоверное снижение амплитуды Ca^{2+} -тока двигательного NO лягушки до $87.3 \pm 1.2\%$ ($n=4$; $p<0.01$) относительно контроля, без изменения длительности третьей фазы. Таким образом, NO уменьшает кальцевый ток NO, что может опосредовать ингибирующее влияние NO на секрецию медиатора.

Исследование роли гуанилатциклазной системы в эффектах NO на секрецию медиатора и ионные токи NO. Для повышения внутриклеточной концентрации цГМФ использовали мембранопроницающие аналоги: дб-цГМФ, 8Br-цГМФ.

¹ Данная часть работы выполнена совместно с ассистентом КГМУ. к.б.н. С.Н. Гришиным

Добавление аналогов цГМФ (100 мкМ или 1 мМ) не изменяло ни параметров ответа НО, ни амплитуду и квантовый состав ТКП (рис. 2А). Для увеличения концентрации цГМФ в НО использовали также селективный ингибитор цГМФ-фосфодиэстеразы - запринаст в концентрации 100 мкМ. Добавление запринаста не приводило к изменениям вызванной секреции медиатора и потенциалзависимого K^+ -тока НО. Донор НО - SNP, после часовой инкубации нервно-мышечного препарата в растворе Рингера, содержащего 8Вг-цГМФ, дб-цГМФ или запринаст, не изменял достоверно ни параметров ответа НО, ни амплитуду и квантовый состав ТКП в течение всего эксперимента (рис. 2А).

Селективный блокатор гуанилатциклазы - ODQ в концентрации 0.1 мкМ вызывал достоверное снижение вызванной секреции медиатора. Средняя амплитуда и квантовый состав ТКП уменьшались до $40.5 \pm 0.9\%$ и $73.9 \pm 2.3\%$ ($n=6; p<0.05$), соответственно, относительно контроля.

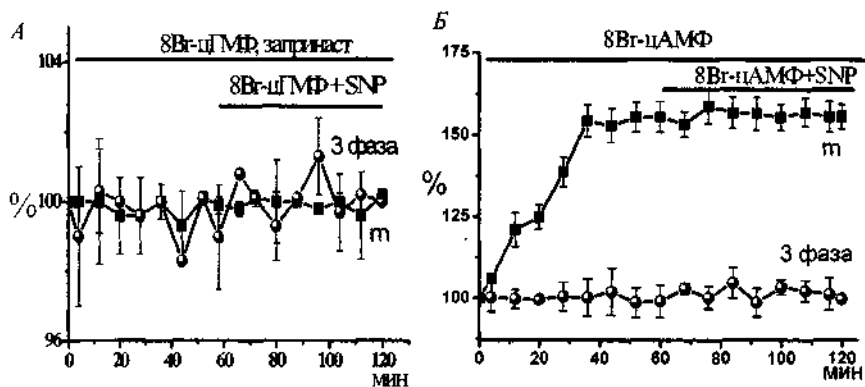


Рис. 2. Эффекты НО на секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания при повышении внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов. Изменение третьей фазы ответа нервного окончания (НО) и квантового состава токов концевой пластинки (ТКП) (т) при действии: А. - 8Вг-цГМФ и SNP на фоне 8Вг-цГМФ; Б. - 8Вг-цАМФ и SNP на фоне 8Вг-цАМФ. По оси абсцисс - время в мин от начала эксперимента, по оси ординат - изменение квантового состава ТКП (•) и третьей фазы ответа НО (•) в % относительно исходных значений. Концентрации всех веществ - 100 мкМ.

В условиях сниженной активности гуанилатциклазы эффекты SNP сохранялись, но были менее выражены, чем в норме: средняя амплитуда ТКП снижалась до $11.8 \pm 0.4\%$, а квантовый состав ТКП до $41.1 \pm 1.4\%$ ($n=6; p<0.05$) относительно контроля. Амплитуда 3-ей фазы ответа НО достоверно возрастала до $160.9 \pm 5.8\%$ ($n=6; p<0.05$) относительно контроля. Таким образом, повышение концентрации цГМФ в НО снимало эффекты НО на секрецию медиатора и потенциалзависимый K^+ -ток, а в условиях пониженного синтеза цГМФ эффекты НО были менее выражены, чем в контроле. Можно предположить что,

повышение концентрации цГМФ опосредует модулирующие эффекты NO на синаптическую передачу, но и существуют цГМФ-независимые системы реализации эффектов NO.

Исследование роли аденилатциклазной системы в эффектах NO на секрецию медиатора и ионные токи НО. Добавление 8Br-цАМФ (100 мкМ) вызывало прогрессирующее увеличение амплитуды и квантового состава ТКП до $189.3 \pm 7.8\%$ и $152.8 \pm 3.1\%$ ($n=10$; $p<0.05$), соответственно, относительно контроля, не изменяя амплитудно-временных параметров ответа НО (рис. 2Б). На фоне повышенной внутриклеточной концентрации цАМФ (часовая инкубации препарата в растворе Рингера с 8Br-цАМФ в концентрации 100 мкМ) SNP не вызывал достоверных изменений ни амплитуды и квантового состава ТКП, ни амплитуды третьей фазы ответа НО (рис. 2Б).

Добавление в раствор Рингера специфического ингибитора аденилатциклазы - PCA в концентрации 1 мкМ вызывало достоверное уменьшение секреции медиатора без изменения параметров ответа НО. Средняя амплитуда и квантовый состав ТКП при действии PCA уменьшались до $31.6 \pm 2.7\%$ и $21.7 \pm 4.9\%$ ($n=5$; $p<0.05$), соответственно, относительно контроля. В условиях сниженной активности фермента (часовая инкубация нервно-мышечного препарата в растворе с PCA) SNP уменьшал амплитуду ТКП до $7.2 \pm 1.1\%$, а квантовый состав ТКП снижался до $5.3 \pm 0.6\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля. Амплитуда потенциалзависимого K^+ -тока возрастала до 139.1 ± 7.4 ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля. Возможно, эффекты NO не связаны с непосредственным уменьшением активности аденилатциклазы, а опосредуются влиянием на другие звенья аденилатциклазной системы. Таким образом, повышение внутриклеточной концентрации цАМФ, также как и увеличение концентрации цГМФ снимало модулирующие эффекты NO на секрецию медиатора и потенциалзависимый K^+ -ток двигательного НО. Было предположено, что ингибирующее действие NO на вызванную секрецию медиатора и активирующее - на потенциалзависимый K^+ -ток может опосредоваться через изменение концентрации цАМФ, которая зависит от активности цГМФ-специфичных цАМФ-фосфодиэстераз.

Исследование роли цГМФ-ингибируемой цАМФ-специфичной фосфодиэстеразы в эффектах NO на секрецию медиатора и ионные токи НО. Известно, что цГМФ может регулировать концентрацию цАМФ в цитозоле через изменение скорости гидролиза цАМФ за счет регуляции активности цГМФ-ингибируемой и цГМФ-стимулируемой цАМФ-специфичных фосфодиэстераз [Lucas et al., 2000]. Ингибиторы цАМФ-фосфодиэстераз подавляют активность ферментов, и в результате происходит пассивное накопление цАМФ в цитоплазме клетки [Essayan, 1999]. Добавление селективного блокатора цГМФ-ингибируемой цАМФ-фосфодиэстеразы - милринона концентрации 20 и 100 мкМ не влияло непосредственно ни на электрогенез НО, ни на секрецию медиатора в течение всего эксперимента. На

фоне действия милринона эффекты SNAP на секрецию медиатора и потенциалзависимый K^+ -ток сохранялись. Можно предположить, что цГМФ-ингибируемая цАМФ-фосфодиэстераза не принимает участие в эффектах NO на секрецию медиатора и ионные токи NO. Возможно, что данная ферментная система отсутствует в NO лягушки.

Исследование роли цГМФ-стимулируемой цАМФ-специфичной фосфодиэстеразы в эффектах NO на секрецию медиатора и ионные токи NO. Добавление блокатора цГМФ-стимулируемой цАМФ-фосфодиэстеразы - EHNA в концентрации 100 мкМ в перфузируемый раствор приводило к заметному увеличению амплитуды и квантового состава ТКП. Через 40 мин действия вещества средняя амплитуда ТКП возрастала до $258.3 \pm 16.3\%$, а квантовый состав до $382.6 \pm 5.1\%$ ($n=5$; $p<0.05$) исходной величины (рис. 3А). Амплитуда 3 фазы, отражающей потенциалзависимый калиевый ток NO, достоверно снижалась до $84.2 \pm 1.2\%$ ($n=5$; $p<0.05$) относительно контроля (рис. 3Б).

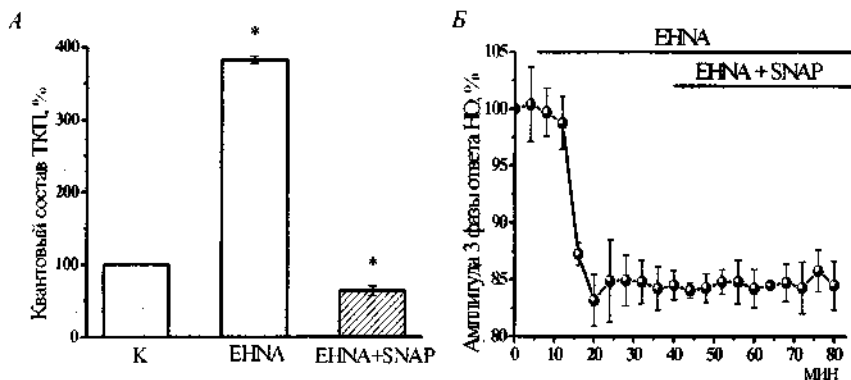


Рис. 3. Влияние NO на секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания при блокировании цГМФ-стимулируемой цАМФ-специфичной фосфодиэстеразы. А. - Эффекты блокатора фосфодиэстеразы II - EHNA (100 мкМ) на квантовый состав токов концевой пластинки (ТКП) и SNAP (250 мкМ) на фоне ингибитора EHNA. За 100% приняты значения в контрольном растворе Рингера. К - контроль; * - $p<0.05$. Б. - Изменение амплитуды потенциалзависимого K^+ -тока при действии EHNA и SNAP на его фоне. По оси абсцисс время от начала эксперимента (в мин); по оси ординат амплитуда 3 фазы ответа нервного окончания в %.

Можно предположить, что цГМФ-стимулируемая цАМФ-фосфодиэстераза проявляет свою активность в NO лягушки и ее ингибирование оказывает эффекты, противоположные действию NO: как на секрецию медиатора, так и на потенциалзависимый K^+ -ток. В условиях ингибирования цГМФ-стимулируемой цАМФ-фосфодиэстеразы (часовая перфузия нервно-мышечного препарата раствором Рингера с EHNA) SNAP достоверно уменьшал амплитуду ТКП до

39.7±5.7%, а квантовый состав ТКП снижался до 63.5±6.9% (n=5; p<0.05) относительно контроля (рис. 3А). Амплитуда 3 фазы и длительность ответа НО в течение всего эксперимента достоверно не изменялись (рис. 3Б).

Таким образом, снижение активности цГМФ-стимулируемой цАМФ-фосфодиэстеразы ослабляет ингибиторное действие НО на вызванную секрецию медиатора и устраняет активирующее влияние НО на потенциалзависимый K⁺-ток. Возможно, эффекты НО в нервно-мышечном синапсе опосредуются через изменение активности цГМФ-стимулируемой цАМФ-специфичной фосфодиэстеразы, контролирующей внутриклеточную концентрацию цАМФ и цАМФ-зависимых протеинкиназ.

Исследование роли протеинкиназы А в эффектах НО на ионные токи НО и вызванную секрецию медиатора. цАМФ-зависимая протеинкиназа или протеинкиназа А опосредует большинство биологических эффектов цАМФ во всех клетках эукариот и является ключевым ферментом аденилатциклазного пути передачи сигнала. Добавление в перфузируемый раствор селективного ингибитора протеинкиназы А - Н-89 в концентрации 10 мкМ не изменяло параметров ответа НО в течение всего эксперимента, но быстро и достоверно подавляло вызванную секрецию медиатора. Средняя амплитуда и квантовый состав ТКП снижались до 58.7±2.6% и 68.6±6.1% (n=5; p<0.05), соответственно, относительно исходных величин. На фоне действия Н-89 SNAP не изменял ни амплитуду, ни длительность 3 фазы ответа НО, и уменьшал среднюю амплитуду ТКП до 41.0±6.8%, а квантовый состав ТКП - до 36.1±5.5% (n=5; p<0.05) относительно исходной величины.

Таким образом, блокирование протеинкиназы А снимает активирующие действие НО на потенциалзависимые K⁺-каналы и ослабляет ингибирующее действие SNAP на вызванную секрецию медиатора. Можно думать, что активация потенциалзависимого калиевого тока при действии НО связана со снижением активности ПКА, которая также опосредует эффекты НО на вызванную секрецию медиатора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование было направлено на изучение систем внутриклеточной сигнализации в реализации эффектов НО на нервно-мышечную передачу. Показано, что НО оказывает ингибирующее действие на секрецию медиатора из двигательных нервных окончаний лягушки. Действие НО может быть связано как с изменением длительности ПД путем модуляции выходящего K⁺-тока, так и с непосредственным уменьшением величины Ca²⁺-тока. В нервно-мышечном синапсе эффекты НО опосредуются через изменение активности как гуанилатциклазного, так и аденилатциклазного метаболических каскадов, что, в конечном счете, приводит к уменьшению уровня цАМФ и цАМФ-зависимых протеинкиназ. Концентрация цАМФ в нервном окончании может регулироваться цГМФ-зависимыми цАМФ-специфичными

фосфодиэстеразами, которые способны переключать или интегрировать различные сигнальные пути в клетке. Предположено, что NO активирует растворимую форму гуанилатциклазы, тем самым, увеличивая концентрацию цГМФ. Повышение концентрации цГМФ ведет к активации цГМФ-стимулируемой фосфодиэстеразы и к усилению гидролиза цАМФ. Снижение концентрации цАМФ в нервном окончании снижает активность цАМФ-зависимых протеинкиназ, что, в свою очередь, ведет к уменьшению секреции медиатора и усилению потенциалзависимого К-тока нервного окончания. Кроме того, NO может модулировать потенциалзависимые K^+ - и Ca^{2+} -каналы с внешней и внутренней стороны мембраны путем S-нитрозилирования, образования свободных форм кислорода и пероксинитритов или модуляции Ca-каналов внутриклеточных депо [Pan et al, 1996; Реутов и др., 1998; Erxleben, Hermann, 2001; Scwingshakl et al., 2002].

ВЫВОДЫ

1. Экзогенные (SNP, SNAP), эндогенные (гидроксиламин) доноры оксида азота (II) и субстрат для NO-синтазы - L-аргинин угнетают вызванную секрецию медиатора и активируют потенциалзависимый калиевый ток в двигательном нервном окончании лягушки. SNAP уменьшает амплитуду кальциевого тока двигательного нервного окончания.

2. Увеличение концентрации цГМФ в нервном окончании с помощью мембранопроницающих аналогов (дб-цГМФ, 8Br-цГМФ) и ингибитора цГМФ-специфичной фосфодиэстеразы V снимает действие оксида азота (II) на секрецию медиатора и потенциалозависимый калиевый ток нервного окончания.

3. Снижение синтеза цГМФ путем блокирования растворимой гуанилатциклазы приводит к ослаблению угнетающего действия доноров оксида азота (II) на освобождение медиатора и активирующего действия на потенциалзависимые калиевые каналы нервного окончания.

4. Повышение внутриклеточной концентрации цАМФ в нервном окончании снимает эффекты оксида азота (II) на секрецию медиатора и потенциалзависимые калиевые каналы.

5. Уменьшение синтеза цАМФ с помощью ингибитора аденилатциклазы не изменяет эффектов оксида азота (II) на вызванное высвобождение медиаторов и потенциалзависимые калиевые токи.

6. Ингибирование фосфодиэстеразы III не влияет на эффекты оксида азота (II) на вызванную секрецию медиатора и потенциалзависимый калиевый ток, что свидетельствует о том, что цГМФ-ингибируемая цАМФ-специфичная фосфодиэстераза не принимает участие в эффектах оксида азота (II) на секрецию медиатора и ионные токи нервного окончания.

7. Ингибирование цГМФ-стимулируемой фосфодиэстеразы II увеличивает вызванную секрецию медиатора и уменьшает амплитуду потенциалзависимого калиевого тока, оказывая эффекты противоположные действию оксида азота (II). В условиях блокирования цГМФ-стимулируемой фосфодиэстеразы II

ослабляется угнетающее действие оксида азота (II) на вызванную секрецию и полностью устраняется активирующий эффект оксида азота (II) на потенциалзависимый калиевый ток.

8. Блокирование протеинкиназы А снимает активирующее действие оксида азота (II) на потенциалзависимые калиевые каналы и ослабляет ингибирующее действие на вызванную секрецию медиатора нервного окончания.

9. Активация гуанилатциклазы оксидом азота (II) и усиление синтеза цГМФ; приводит к увеличению скорости гидролиза цАМФ цГМФ-стимулируемой фосфодиэстеразой. Таким образом, мишенью действия оксида азота (II) в нервном окончании холоднокровных является цАМФ-зависимая протеинкиназа.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Зефиров А.Л., Халиуллина Р.Р., Анучин А.А., Яковлев А.В. Влияние эндогенного оксида азота на функционирование нервно-мышечного синапса // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 2001. - Т. 87 - № 4, - С. 499-506.
2. Яковлев В.А., Ситдикова Г.Ф., Зефиров А.Л. Роль циклических нуклеотидов в эффектах оксида азота на нервно-мышечную передачу // В кн: «Двигательная активность: Нейрофизиологические исследования» (ред. И.Н. Плещинский). Казань. - 2001. - Тан. - С. 96-102.
3. Яковлев В.А., Ситдикова Г.Ф., Зефиров А.Л. Циклические нуклеотиды в эффектах оксида азота на нервно-мышечную передачу // В кн: «Функциональная роль монооксида азота и пуринов» (ред. В.Н. Гурин). - Минск. - 2001. - С. 208-211.
4. Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф., Зефиров А.Л. Роль циклических нуклеотидов в эффектах оксида азота (II) на секрецию медиатора и электрогенез двигательного нервного окончания // Доклады Академии Наук. - 2002. - Т. 382, - № 2, - С. 273-276.
5. Yakovlev A.V., Sitdikova G.F., Zefirov A.L. Role the cGMP- and cAMP-dependent systems in effects of nitric oxide on transmitter release and potassium currents in the frog neuromuscular junction // Neurophysiology. - 2002. - Т. 34, - No 2/3. - P. 267-269.
6. Ситдикова Г.Ф., Яковлев А.В., Зефиров А.Л., Архипова О.В. Эффекты L-и D-стереоизомеров аргинина на секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания // Доклады Академии Наук. - 2003. - Т.393. - № 5. - С. 15-19.
7. Yakovlev A., Sitdikova G., Grishin S., Arkhipova O., Zefirov A. Targets and effects of nitric oxide (II) in synaptic transmission // Abstr. of Conf. "Transmitters and guiding signals in the formation of cortical networks". La Ciotat. - France. - 2003. - P. 20-22.
8. Khaliullina R.R., Anuchin A.A., Yakovlev A.V., Zefirov A.L. Role of endogenous nitric oxide in function of neuromuscular synapse // Abst. of 5th IBRO World Congr. of Neurosci.- Jerusalem. -Israel. - 1999. - P. 213.

9. Яковлев А.В. Роль цАМФ в эффектах оксида азота (II) на вызванную секрецию медиатора нервно-мышечного синапса // Тез. докл. 74^{ой} Студ. науч. конф. - Казань. - 2000. - С. 73.

Ю.Яковлев А.В., Анучин А.А., Ситдикова Г.Ф., Мухамедьяров М.А. Роль вторичных посредников (цАМФ, цГМФ) в эффектах оксида азота в нервно-мышечном синапсе // Тез. докл. VII Всероссийской школы молодых ученых «Актуальные проблемы нейробиологии». - Казань. - 2000. - С. 106-107.

П.Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф., Зефилов А.Л. Роль циклического АМФ в эффектах NO на функцию нервно-мышечного синапса // Тез. докл. VIII Всерос. конф. «Физиология нейротрансмиттеров». - Москва. - 2000. - С. 103.

12. Яковлев А.В., Анучин А.А., Мухамедьяров М.А., Халиуллина Р.Р. Роль оксида азота (II) в • развитии кратковременных форм пресинаптической пластичности в нервно-мышечном синапсе лягушки // Тез. докл. 5^{ой} Конф. мол. ученых. - Пушино-2001. - С. 105.

И.Яковлев В.А., Ситдикова Г.Ф., Зефилов А.Л. Двухфазные эффекты оксида азота на нервно-мышечную передачу // Тез. докл. XVIII Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. - Казань. - 2001. - С. 289.

14. Яковлев А.В., Архипова О.В., Гарипова В.Р. Влияние ингибиторов аденилатциклазы и гуанилатциклазы на нервно-мышечную передачу // Тез. докл. XL Междунар. научн. студ. конф. «Студент и научно-технический прогресс». — Новосибирск. - 2002 - С. 216-217.

15. Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф., Анучин А.А., Мухамедьяров М.А. Исследование роли цАМФ и цГМФ в эффектах оксида азота (II) в нервно-мышечном синапсе лягушки // Тез. докл. 5^{ой} Конф. молодых ученых. - Пушине -2001.-С. 190-191.

16. Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф. Влияние эндогенного оксида азота на нервно-мышечную передачу // Тез. докл. XXXIX Междунар. научн. студ. конф. «Студент и научно-технический прогресс». - Новосибирск. - 2001. - С. 145-146.

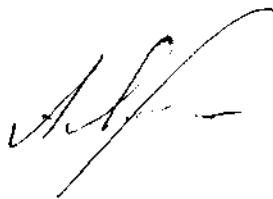
17. Ситдикова Г.Ф., Яковлев В.А., Зефилов А.Л. Дозозависимое влияние доноров монооксида азота на изолированное сердце лягушки // Сбор. статей конф. «Функциональная роль монооксида азота и пуринов». - Минск. — 2001. - С. 158-161.

18. Яковлев А.В., Архипова О.В., Ситдикова Г.Ф., Зефилов А.Л. Эффекты доноров монооксида азота на секрецию и ионные токи нервного окончания // Тез. докл. 6^{ой} Конф. мол. ученых "Биология - наука 21-го века". - Пушине — 2002.-С. 168.

19. Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф., Зефилов А.Л. Механизмы влияния высоких концентраций L-аргинина на секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки // Тез. докл. IV Съезда физиологов Сибири. - Новосибирск. - 2002. - С. 313.

20. Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф., Зефилов А.Л. Механизмы эффектов монооксида азота на нервно-мышечную передачу // Тез. докл. II Междунар. конф. по физиологии мышц и мышечной деятельности. - Москва. - 2003. - С.61-62.

21. Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф. Исследование влияния ингибитора фосфодиэстеразы III на секрецию и ионные токи нервного окончания лягушки // Тез. докл. Пироговской студ. научн. конф. - Москва. 2003. - С. 224.
22. Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф., Архипова О.В., Зефилов А.Л. Механизмы действия монооксида азота в нервно-мышечном синапсе // Тез. докл. Междунар. конф. «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». - Пущине - 2003 - С. 206-208.
23. Yakovlev A., Sitdikova G., Archipova O., Zefirov A. Role of cGMP-stimulated phosphodiesterase in inhibitory effects of nitric oxide (II) on neuromuscular transmission // Abstr. Symp. "Neuron differentiation and plasticity regulation by intercellular signals". Moscow. - 2003. - P. 72.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and strokes, likely representing the initials or full name of the author.

*Отпечатано в ООО «Печатный двор».
Казань, ул. Журналистов, 1/16.
Лицензия ПД №7-0215 от 01.11.01
Выдана Поволжским межрегиональным
территориальным управлением МПТР РФ.
Подписано в печать 01.12.03. Усл.п.л. 1,0.
ЗаказМК-1161. Формат 60х90 1/16. Тираж 100 экз.
Бумага офсетная. Печать -ризография*